

## Beschreibung

### Stabile wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzungen

5

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind wässrige Zusammensetzungen, die G-CSF enthalten, G-CSF-Lyophilisate oder -Pulver, sowie Arzneimittel-Kits, die diese Lyophilisate oder Pulver enthalten.

10 G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor; Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor) ist ein natürlich vorkommender Wachstumsfaktor, der zur Familie der Zytokine gehört. G-CSF spielt eine entscheidende Rolle bei der Hämatopoese und fördert Reifung, Proliferation, Differenzierung und Überleben von Neutrophilen und neutrophilen Nachkommenzellen. G-CSF wird klinisch  
15 hauptsächlich bei der Tumorbekämpfung und insbesondere zur Behandlung von Neutropenie als Folge von Chemotherapie eingesetzt und findet ferner auch bei Knochenmarkstransplantationen und bei der Behandlung von Infektionskrankheiten Verwendung.

20 Humanes G-CSF in seiner natürlich vorkommenden Form ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 20 000 und weist fünf Cystein-Reste auf. Vier dieser Reste bilden zwei intramolekulare Disulfidbrücken, die für die Aktivität des Proteins von wesentlicher Bedeutung sind. Da G-CSF aus seinen natürlichen Quellen nur in geringen Mengen erhältlich ist, werden zur  
25 Herstellung von Arzneimitteln hauptsächlich rekombinante Formen von G-CSF verwendet, die beispielsweise durch Expression in Säugerzellen wie CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zellen oder Prokaryontenzellen wie E. Coli erhalten werden können. Die in Säugerzellen exprimierten rekombinanten Proteine unterscheiden sich von natürlich vorkommendem G-CSF durch das  
30 unterschiedliche Glykosylierungsmuster, während bei den in E. Coli exprimierten Proteinen, die als Folge der bakteriellen Expression einen

BEST AVAILABLE COPY

zusätzlichen N-terminalen Methioninrest aufweisen können, die Glykosylierung vollständig fehlt.

Formulierungen von G-CSF sind aufgrund der hohen Hydrophobizität des Proteins relativ instabil, was besonders für die nicht-glykosylierten rekombinanten Formen des Proteins gilt. Da das Molekül leicht an die Wand von Ampullen, Spritzen o.ä. adsorbiert, Dimere oder höhere Aggregate bildet und chemischen Veränderungen wie Deamidierung, Oxidation, Spaltung von Disulfidbrücken oder Proteolyse unterliegt, kommt es so insbesondere bei längerer Lagerung des Proteins häufig zu Aktivitätsverlusten. Dies ist einerseits aus Kostengründen und andererseits aus therapeutischen Gründen nachteilig, beispielsweise wenn das G-CSF über einen längeren Zeitraum in konstanter Dosierung eingesetzt werden soll. Ferner können die beispielsweise durch Dimerisierung, Oxidation oder Abbau entstandenen Produkte zu möglicherweise unerwünschten Immunreaktionen führen. Herkömmliche G-CSF-Formulierungen sind ferner empfindlich gegenüber mechanischem Stress, wie er beispielsweise durch Schütteln beim Transport der flüssigen Formulierungen auftreten kann, und gegenüber ein- oder mehrmaligem Einfrieren und Auftauen. Beides kann ebenfalls zu einer unerwünschten Bildung von Multimeren und Aggregaten sowie zu Aktivitätsverlust führen.

Die DE-A-37 23 781 beschreibt Arzneimittel mit G-CSF als Wirkstoff, die zur Stabilisierung des Wirkstoffs mindestens ein pharmazeutisch verträgliches grenzflächenaktives Mittel, Saccharid, Protein oder eine pharmazeutisch verträgliche hochmolekulare Verbindung enthalten. Als besonders vorteilhafte grenzflächenaktive Mittel werden Polyoxyethylensorbitanester von aliphatischen Fettsäuren, beispielsweise das Monooleat oder das Monolaureat, vorgeschlagen, die zusammen mit Humanserumalbumin und Mannit eingesetzt werden. Die grenzflächenaktiven Mittel werden bevorzugt in einer Menge von 1 bis 10000 Gewichtsteilen pro Gewichtsteil G-CSF eingesetzt. Die wässrigen phosphatgepufferten Formulierungen, für die ein pH-Wert von 7,4 angegeben wird, sind bei 4°C über längere Zeit stabil.

Die beschriebenen pharmazeutischen Formulierungen haben jedoch einige Nachteile. So ist die Anwesenheit von Tensiden wie Polyoxyethylensorbitanmonooleat (Tween<sup>®</sup> 80) besonders bei höheren Konzentrationen medizinisch nicht unbedenklich, da es bei der Verabreichung des Arzneimittels zu lokalen Irritationen kommen kann. Ferner wurde beschrieben, dass solche Tenside in den beschriebenen Phosphatpuffern bei höheren Temperaturen wegen der besseren Zugänglichkeit des freien Cysteinrestes von G-CSF die unerwünschte Bildung von Dimeren und Multimeren fördern, so daß die Aktivität von G-CSF bei höheren Temperaturen sehr schnell abnimmt. Die zusätzlich in großen Mengen als Stabilisatoren eingesetzten Proteine und Peptide menschlichen und tierischen Ursprungs bergen ebenfalls ein Risikopotential, da sie wegen ihrer antigenen Eigenschaften immunologische Reaktionen beim Menschen hervorrufen können und auch virale Verunreinigungen nicht vollständig auszuschließen sind.

Die EP-A-0 373 679 offenbart, dass G-CSF über längere Zeit stabil gehalten werden kann, wenn es in Lösungen mit einem pH-Wert von 2,75 bis 4,0 formuliert wird, die vorteilhaft eine möglichst geringe Leitfähigkeit aufweisen. Um die Aggregation von G-CSF zu vermeiden, wird in diesen Formulierungen bevorzugt kein Puffer verwendet, in geringen Mengen von weniger als 2mM können jedoch Carbonsäuren, Citronensäure, Milchsäure oder Weinsäure als Puffersubstanzen eingesetzt werden. Stabile Formulierungen mit pH-Werten nahe dem physiologischen pH-Wert sind jedoch unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Herman, A.C. et al. ("Characterisation, Formulation, and Stability of Neupogen<sup>®</sup> (Filgrastim), a Recombinant Human Granulocyte-Colony Stimulating Factor." In: Formulation Characterisation and Stability of Protein Drugs, S. 303-328, R. Pearlman und Y.J. Wang, Hrsg., Plenum Press, New York, 1996) beschreiben stabilisierte Zusammensetzungen von nichtglykosyliertem rekombinantem G-CSF, die 10 mM Natriumacetat, pH 4,0, 5% Mannit und 0,004% Polysorbat-80 enthalten. Derartige Zusammensetzungen sind bei 2-8°C mehr

als 24 Monate stabil. Stabile Zusammensetzungen mit höheren pH-Werten sind jedoch mit diesem System nicht möglich.

Die WO-A-94/14466 offenbart G-CSF-haltige wässrige pharmazeutische  
5 Zubereitungen, die Essigsäure, Milchsäure, Citronensäure, Maleinsäure, Phosphorsäure, Arginin und Salze davon als Puffersubstanzen enthalten können und pH-Werte zwischen 2,5 und 5,0 und zwischen 7 und 8 aufweisen. Durch diese Zubereitungen wird die Bildung von Multimeren und Aggregaten von G-CSF bei mechanischen Belastungen, wie sie beispielsweise beim  
10 Schütteln von Lösungen auftreten, reduziert. Insbesondere bei höheren Temperaturen nimmt die Aktivität von G-CSF in diesen Zubereitungen jedoch rasch ab und die Langzeitstabilität ist nicht zufrieden stellend.

Die EP-A-0 306 824 beschreibt stabilisierte Präparate von Humanproteinen,  
15 insbesondere Erythropoietin, bei denen die Stabilisierung durch Zugabe von Harnstoff, Aminosäuren und Detergens erfolgt. In den für Injektionslösungen verwendeten Puffern, beispielsweise Phosphatpuffern, ist G-CSF bei höheren Temperaturen jedoch nicht stabil genug.

20 Die WO-A-94/14465 offenbart lyophilisierte pharmazeutische Zubereitungen von G-CSF, die Maltose, Saccharose, Raffinose, Trehalose oder Aminozucker enthalten. Die wässrigen Lösungen dieser Lyophilisate sind jedoch über längere Zeiträume ebenfalls nicht hinreichend stabil.

25 Die EP-A-1 197 221 offenbart langzeitstabile G-CSF-Formulierungen mit pH-Werten zwischen 5 und 7, die ein oder mehrere Aminosäuren aus der Gruppe Lysin, Histidin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Threonin und Asparagin sowie ein oder mehrerer hydrophobe Aminosäuren enthalten. Zur Vermeidung der Oxidation von Methioninresten im G-CSF-Molekül wird der  
30 Formulierung die Aminosäure Methionin zugesetzt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzungen bereitzustellen, die auch in Abwesenheit von Serumproteinen über einen breiten pH-Bereich und bei höheren Temperaturen über einen längeren Zeitraum stabil sind und sich insbesondere zur pharmazeutischen Anwendung eignen.

Es wurde nun überraschend gefunden, dass wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzungen, die Succinat und/oder Tartrat als Puffersubstanzen enthalten, auch bei höheren Temperaturen über einen breiten pH-Bereich und sogar bei pH-Werten, die nahe den physiologischen Bedingungen liegen, über lange Zeit stabil sind, da in solchen Zusammensetzungen kaum chemische Veränderungen wie Dimerisierung oder Oxidation des G-CSF-Moleküls auftreten. Daher geht auch bei längerer Lagerung kaum Aktivität verloren. Auch bei der Rekonstitution oder dem Auflösen von G-CSF-haltigen Lyophilisaten oder Pulvern, bei mechanischer Belastung, wie sie beispielsweise beim Filtrieren G-CSF-haltiger Zusammensetzungen, beim Abfüllen in Ampullen, beim Aufziehen in Spritzen und beim Transport auftreten kann, und beim Einfrieren und Auftauen verhindert die Anwesenheit von Succinat und/oder Tartrat unerwünschte Aggregatbildung oder andere Nebenreaktionen des G-CSF-Proteins und damit Aktivitätsverluste.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind demnach wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzungen, welche als Puffersubstanzen Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfassen, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung pharmazeutischer Präparate.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Lyophilisate und Pulver, die G-CSF sowie Succinat und/oder Tartrat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon umfassen, Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung zur Herstellung pharmazeutischer Präparate.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Arzneimittel-Kits, die räumlich voneinander getrennt a) ein G-CSF-haltiges Lyophilisat oder Pulver; und b) ein wässriges Lösungsmittel, welches Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, enthält, umfasst.

5

Weitere Ausführungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Ansprüchen und der nachfolgenden Beschreibung.

Fig. 1 zeigt den Restgehalt von monomerem G-CSF nach 4 und 8 Wochen  
10 Inkubation bei 25°C in 20 mM Succinatpuffer bei pH-Werten zwischen 4,5 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0, bestimmt durch RP-HPLC und ausgedrückt als % Peakfläche (PA) des Anfangsgehalts an monomerem G-CSF (100 %) an Tag 0.

15 Fig. 2 zeigt den Restgehalt von monomerem G-CSF nach 4 und 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 10 mM Succinatpuffer bei pH-Werten zwischen 4,0 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

Fig. 3 zeigt den Restgehalt von monomerem G-CSF nach 4 und 8 Wochen  
20 Inkubation bei 25°C in 5 mM Succinatpuffer bei pH-Werten zwischen 4,0 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

Fig. 4 zeigt den Restgehalt von monomerem G-CSF nach 4 und 8 Wochen  
25 Inkubation bei 25°C in 20 mM Tartratpuffer bei pH-Werten zwischen 4,0 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

Fig. 5 zeigt den Restgehalt von monomerem G-CSF nach 4 und 8 Wochen  
Inkubation bei 25°C in 10 mM Tartratpuffer bei pH-Werten zwischen 4,5  
und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

30

Fig. 6 zeigt den Restgehalt von monomerem G-CSF nach 4 und 8 Wochen Inkubation bei 25°C in 5 mM Tartratpuffer bei pH-Werten zwischen 4,0 und 6,0 im Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

5 Fig. 7 zeigt den Restgehalt von monomerem G-CSF nach 13 und 20 Tagen Inkubation bei 37°C in 10 mM Phosphatpuffer bei pH 4,5, 5,0 und 7,5.

Fig. 8 zeigt den Restgehalt von monomerem G-CSF nach 30 und 90 Tagen Inkubation bei 37°C in 10 mM Succinat- oder Tartratpuffer bei pH 5,0 im  
10 Vergleich mit 10 mM Acetatpuffer bei pH 4,0.

Das G-CSF-Protein in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann jedes beliebige G-CSF-Protein von Säugern, insbesondere Menschen, oder eine davon abgeleitete Variante sein, sofern diese Variante im Wesentlichen die  
15 für humanen G-CSF charakteristische biologische Aktivität bei der Hämatopoese besitzt. Der Begriff G-CSF, wie er hier verwendet wird, umfasst demnach sowohl G-CSF natürlicher Herkunft als auch synthetisch oder rekombinant hergestellten G-CSF sowie Varianten davon, beispielsweise rekombinante humane Proteine mit einem N-terminalen Methioninrest, wie sie  
20 bei der Expression des G-CSF-Gens in Prokaryonten erhalten werden, Fusionsproteine von G-CSF, sowie G-CSF-Proteine, wie sie die durch Austausch, Deletion oder Insertion von ein oder mehreren Aminosäuren des natürlich vorkommenden G-CSF erhalten werden. G-CSF kann glykosyliert oder nicht-glykosyliert sein. Nicht-glykosylierter G-CSF wird beispielsweise bei der  
25 Expression in Prokaryontenzellen wie E. Coli erhalten, während glykosylierter G-CSF entweder bei der Isolierung aus natürlichen Quellen, bei der Expression in Eukaryontenzellen wie CHO-Zellen oder durch synthetische Glykosylierung erhalten werden kann. Synthetisch modifizierter G-CSF kann beispielsweise durch enzymatische Glykosylierung oder auch durch chemische PEGylierung  
30 erhalten werden. G-CSF-Varianten, wie sie in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verwendet werden können, sind beispielsweise in der EP-A-0 456 200 beschrieben. Bevorzugt wird rekombinanter, nicht-

glykosylierter G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verwendet, besonders bevorzugt umfaßt der G-CSF die Aminosäuresequenz von humanem G-CSF, wie sie beispielsweise in der DE-A-37 23 781 angegeben ist, oder eine davon abgeleitete Sequenz.

5

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen wässrigen Zusammensetzungen, der Lyophilisate und der Pulver können die Puffersubstanzen Succinat und Tartrat sowohl in Form der freien Säure als auch in Form der Salze eingesetzt werden. Als Salze der Bernsteinsäure und der Weinsäure werden insbesondere die

10 physiologisch verträglichen Salze eingesetzt, beispielsweise Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalze. Bevorzugt sind die Alkali- und Ammoniumsalze, besonders bevorzugt die Di-Natrium-Salze. Falls gewünscht kann die erfindungsgemäße wässrige Zusammensetzung neben Succinat und Tartrat auch noch andere Puffersubstanzen enthalten, dies ist jedoch nicht erforderlich.

15

Die Konzentrationen der Puffersubstanzen Succinat und Tartrat werden vorteilhaft so gewählt, dass bei dem gewünschten pH-Wert sowohl die pH-stabilisierende Wirkung als auch eine ausreichende Pufferkapazität erzielt werden, gleichzeitig aber die Ionenkonzentration und damit die Leitfähigkeit

20 möglichst gering gehalten wird, um Aggregatbildungen zu vermeiden. In der Regel liegen die Konzentrationen, in denen die Puffersubstanzen in der wässrigen Zusammensetzung eingesetzt werden, zwischen 0,5 und 150 mM, vorzugsweise zwischen 1 und 100 mM und ganz besonders bevorzugt zwischen 1 und 50 mM, beispielsweise zwischen 2 und 20 mM. Falls Succinat

25 und Tartrat gemeinsam eingesetzt werden, liegt die Gesamtkonzentration dieser Puffersubstanzen vorteilhaft innerhalb dieser Bereiche.

30

Der pH-Wert der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen liegt üblicherweise zwischen 3,5 und 6,0, beispielsweise zwischen 4,0 und 5,9. Vorzugsweise ist der pH größer 4,0 und liegt beispielsweise zwischen 4,1 und 5,7, insbesondere zwischen 4,2 und 5,5, beispielsweise zwischen 4,5 und 5,5. Falls gewünscht kann der pH-Wert auch noch mit Hilfe anderer Säuren oder Basen auf den



gewünschten Wert eingestellt werden. Geeignete Säuren sind beispielsweise Salzsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Citronensäure und Natrium- oder Kaliumdihydrogenphosphat. Geeignete Basen sind beispielsweise Alkali- und Erdalkalihydroxide, Alkalicarbonate, Alkaliacetate, Alkalicitrate und Di-  
5 Alkalihydrogenphosphate; beispielsweise Natriumhydroxid, Natriumacetat, Natriumcarbonat, Natriumcitrat, Di-Natrium- und Di-Kaliumhydrogenphosphat sowie Ammoniak.

Die Konzentration von G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen  
10 ist im Wesentlichen abhängig vom Verwendungszweck. Die obere Grenzkonzentration ergibt sich aus der Löslichkeit von G-CSF im Puffer. In pharmazeutischen Zusammensetzungen liegt G-CSF in einer pharmazeutisch wirksamen Menge vor, wobei die Konzentration gewöhnlich nicht mehr als 5mg/ml beträgt und beispielsweise zwischen 0,0001 und 5 mg/ml,  
15 vorzugsweise zwischen 0,0005 und 4 mg/ml und besonders bevorzugt zwischen 0,001 und 2,5 mg/ml, beispielsweise zwischen 0,01 und 1,5 mg/ml, liegt. In Bulklösungen (höher konzentrierten Ausgangslösungen) kann die Konzentration jedoch auch ohne weiteres 10 mg/ml und mehr annehmen.

20 Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen können weitere übliche, insbesondere physiologisch verträgliche Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und Zusatzstoffe enthalten, beispielsweise Tenside, isotonisierende Mittel, Aminosäuren, Reduktionsmittel, Antioxidantien, Komplexbildner, Cosolventien, Verdünnungsmittel und chaotrope Agenzien.

25

Bevorzugt enthält die erfindungsgemäße Zusammensetzung ein oder mehrere Tenside, beispielsweise nichtionische Tenside, wie sie in der EP-A-1 197 221 beschrieben sind, insbesondere Polyoxyethylensorbitanester aliphatischer Fettsäuren. Hier sind beispielsweise Polyoxyethylensorbitanmonolaureat  
30 (erhältlich unter dem Handelsnamen Polysorbat 20), Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat (Polysorbat 40), Polyoxyethylensorbitanmonostearat (Polysorbat 60), Polyoxyethylensorbitantristearat (Polysorbat 65), Polyoxyethylen-

sorbitanmonooleat (Polysorbat 80) und Polyoxyethylensorbitantrioleat (Polysorbat 85) zu nennen, wobei Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat und Polyoxyethylensorbitanmonooleat bevorzugt sind. Diese Tenside können, falls gewünscht, aufgrund des vorteilhaften stabilisierenden Puffersystems der Erfindung in sehr geringen Mengen eingesetzt werden, beispielsweise in Mengen von 0,0005 bis 0,04 % (w/v), vorzugsweise von 0,001 bis 0,02 % (w/v), bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung.

Vorteilhaft sind die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen, insbesondere wenn sie für pharmazeutische Zwecke eingesetzt werden, mit dem Blut des Patienten isotonisch. Dies kann bereits durch die Wahl geeigneter Konzentrationen an Puffersubstanzen erfolgen. Zur Herstellung physiologisch gut verträglicher Zusammensetzungen können jedoch auch weitere isotonisierende Mittel, beispielsweise Zucker oder Zuckeralkohole, zugesetzt werden. Geeignete isotonisierende Mittel sind beispielsweise Saccharose, Maltose, Fruktose, Lactose, Mannit, Sorbit und Glycerin. Bevorzugt werden Mannit und Sorbit eingesetzt. Es können auch Salze zur Isotonisierung eingesetzt werden, diese werden jedoch üblicherweise nur in geringen Konzentrationen zugegeben, da zu hohe Ionenkonzentrationen die Aggregatbildung von G-CSF fördern. Isotonisierende Mittel werden zweckmäßig in Mengen von bis zu 10,0 % (w/v) zugesetzt, bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung. Bevorzugt werden Mengen von bis zu 7,5 %, besonders bevorzugt bis zu 6,0 %, beispielsweise zwischen 0,1 und 5,5 % (w/v) eingesetzt.

25

Als Aminosäuren können beispielsweise Glycin, Threonin, Tryptophan, Lysin, Hydroxylysin, Arginin, Histidin, Cystein, Ornithin, Phenylalanin, Methionin, Glutamin, Asparagin oder Salze davon eingesetzt werden. Aminosäuren oder Aminosäuresalze werden zweckmäßig in Konzentrationen von 0,1 bis 100 mM, vorzugsweise von 1 bis 50 mM eingesetzt.

30

Als Reduktionsmittel sind insbesondere schwefelhaltige Reduktionsmittel geeignet, beispielsweise Thioglycerin, Glutathion, Dithioglycol, Thiodiglycol, N-Acetylcystein, Thiosorbit, Thioethanolamin, Natriumthiosulfat, Natriumhydrogensulfit, Natriumpyrosulfit, Dithiothreitol oder Thioalkansäuren mit insbesondere 1 bis 7 Kohlenstoffatomen. Reduktionsmittel werden  
5 zweckmäßig in Konzentrationen von 0,1 bis 100 mM, vorzugsweise von 1 bis 50 mM eingesetzt.

Als Antioxidantien können beispielsweise Ascorbinsäure oder ihre Salze,  
10 Ascorbinsäurepalmitat, Ascorbinsäurestearat, Triamylgallat,  $\alpha$ -Tocopherol, Tocopherolacetat und Butylhydroxyanisol verwendet werden. Antioxidantien werden zweckmäßig in Konzentrationen von 0,1 bis 100 mM, vorzugsweise von 1 bis 50 mM eingesetzt.

15 Als Komplexbildner geeignet sind beispielsweise Citrat, Dinatriummethyldiamintetraacetat (EDTA), Natriumpyrophosphat oder Natriummetaphosphat. Bevorzugt wird Citrat, in Form der freien Säure oder eines Salzes davon, als Komplexbildner verwendet. Komplexbildner werden zweckmäßig in Konzentrationen von 0,01 bis 20 mM, vorzugsweise von 0,1 bis  
20 10 mM und ganz besonders bevorzugt von 0,2 bis 5 mM eingesetzt.

Als chaotrope Agenzien können beispielsweise Harnstoff, Guanidinium-Hydrochlorid oder Guanidiniumisocyanat verwendet werden. Chaotrope Agenzien werden zweckmäßig in Konzentrationen von 0,1 bis 50 mM,  
25 vorzugsweise von 1 bis 30 mM eingesetzt.

Falls gewünscht, können die erfindungsgemäßen G-CSF-haltigen Zusammensetzungen auch weitere Proteine wie Humanserumprotein enthalten. Bevorzugt sind aufgrund der mit Fremdproteinen verbundenen Risiken jedoch  
30 Zusammensetzungen, die frei von weiteren Proteinen sind.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzungen kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Üblicherweise werden die Puffersubstanzen und, gegebenenfalls, die weiteren Stabilisierungsmittel und/oder die Hilfs- und Zusatzstoffe zunächst in den geeigneten Mengen in dem wässrigen Lösungsmittel, gewöhnlich sterilem Wasser, gelöst. Falls erforderlich wird der pH-Wert mit Succinat und/oder Tartratlösung oder mit anderen Säuren oder Basen, wie den oben beispielhaft genannten, eingestellt. Nach einem üblichen Sterilisierungsschritt, beispielsweise Filtration durch ein Sterilfilter, wird G-CSF in den gewünschten Konzentrationen zugegeben. Es ist aber auch ohne weiteres möglich, G-CSF in einer wässrigen Lösung vorzulegen und den pH anschließend mit Succinat und/oder Tartrat auf den gewünschten Wert einzustellen.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen finden insbesondere als pharmazeutische Zusammensetzungen Verwendung, wobei die gegebenenfalls vorhandenen Stabilisierungsmittel und die Hilfs- und Zusatzstoffe physiologisch verträglich sein müssen. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in den verschiedenartigsten Applikationsformen eingesetzt werden. Beispielsweise können die Zusammensetzungen als Injektions- oder Infusionslösungen, insbesondere zur intravenösen, intramuskulären oder subkutanen Verabreichung, oder als Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung vorliegen. Die Zusammensetzungen können jedoch auch zur Herstellung weiterer pharmazeutischer Applikationsformen verwendet werden, beispielsweise von Hydrogelen oder Liposomen. Solche pharmazeutischen Zubereitungen können auf sämtlichen Indikationsgebieten eingesetzt werden, auf denen G-CSF zur Anwendung kommen kann, beispielsweise zur Behandlung von Neutropenie, bei Knochenmarkstransplantationen und bei der Behandlung von Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner G-CSF-haltige Lyophilisate und Pulver, die Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfassen. Solche Lyophilisate und Pulver lassen sich

beispielsweise in an sich bekannter und einfacher Weise durch Lyophilisieren oder z.B. durch Sprühtrocknung aus den zuvor beschriebenen wässrigen Zusammensetzungen erhalten. In diesen Lyophilisaten und Pulvern liegen G-CSF, Succinat und/oder Tartrat sowie gegebenenfalls weitere Puffersubstanzen, Stabilisierungsmittel und Hilfs- und Zusatzstoffe in solchen Mengen vor, dass nach erneutem Auflösen in Wasser G-CSF-haltige Zusammensetzungen erhalten werden, die wie die entsprechenden wässrigen Zusammensetzungen auch bei höheren Temperaturen über einen längeren Zeitraum stabil sind.

10

Die erfindungsgemäßen Lyophilisate oder Pulver können beispielsweise in Form eines Arzneimittel-Kits bereitgestellt werden, in dem Lyophilisat oder Pulver räumlich getrennt von einer geeigneten Menge eines wässrigen Lösungsmittels vorliegen. Die stabile gepufferte wässrige Zusammensetzung kann dann zu jedem gewünschten Zeitpunkt, beispielsweise vom medizinischen Personal, hergestellt werden.

Alternativ können die zur Herstellung der stabilen wässrigen Zusammensetzungen erforderlichen Puffersubstanzen und gegebenenfalls die weiteren Stabilisierungsmittel und die Hilfs- und Zusatzstoffe nur im wässrigen Lösungsmittel vorliegen, während Lyophilisat oder Pulver lediglich G-CSF enthalten, oder Puffersubstanzen, Stabilisierungsmittel und Hilfs- und Zusatzstoffe können sowohl im Lyophilisat oder Pulver als auch im wässrigen Lösungsmittel vorliegen.

25

Die vorliegende Erfindung wird nun anhand der folgenden Beispiele näher erläutert, ohne dass in diesen Beispielen eine Beschränkung zu sehen ist.

## Beispiele

### 1. Stabilität G-CSF-haltiger Zusammensetzungen nach Langzeitinkubation und bei erhöhtem pH und erhöhter Temperatur

5

G-CSF-haltige Zusammensetzungen wurden bei Raumtemperatur hergestellt, indem die Puffersubstanzen Succinat und Tartrat in Form der Dinatriumsalze zusammen mit Polysorbat-80 und Mannit zunächst in destilliertem und sterilem Wasser gelöst wurden und anschließend der pH-Wert mit Succinat- oder Tartratpuffer auf den gewünschten Wert eingestellt wurde. Im Handel erhältlicher, nicht-glykosylierter rekombinanter humaner G-CSF wurde nach Filtration durch ein Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm, Millipore®) zugegeben.

Die genauen Formulierungen der hergestellten erfindungsgemäßen Zusammensetzungen und deren pH-Werte sind in den nachfolgenden Tabellen 1 bis 6 angegeben.

**Tabelle 1: G-CSF-haltige Formulierung mit 20 mM Succinatpuffer**

|                          | Formulierung |       |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                          | 1            | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     |
| Substanz                 |              |       |       |       |       |       |       |       |       |
| G-CSF<br>[mg/ml]         | 0,3          | 0,3   | 0,3   | 0,3   | 0,3   | 0,3   | 0,3   | 0,3   | 0,3   |
| Mannit<br>[% w/v]        | 0,5          | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   |
| Polysorbat-80<br>[% w/v] | 0,004        | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| Succinat-<br>puffer [mM] | 20           | 20    | 20    | 20    | 20    | 20    | 20    | 20    | 20    |
| pH                       | 4,00         | 4,25  | 4,50  | 4,75  | 5,00  | 5,25  | 5,50  | 5,75  | 6,00  |

**Tabelle 2: G-CSF-haltige Formulierung mit 10 mM Succinatpuffer**

|  | <b>Formulierung</b> |           |           |           |           |           |           |           |           |
|--|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|  | <b>10</b>           | <b>11</b> | <b>12</b> | <b>13</b> | <b>14</b> | <b>15</b> | <b>16</b> | <b>17</b> | <b>18</b> |
| <b>Substanz</b>                        |                     |           |           |           |           |           |           |           |           |
| <b>G-CSF</b><br>[mg/ml]                | 0,3                 | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       |
| <b>Mannit</b><br>[% w/v]               | 0,5                 | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       |
| <b>Polysorbat-80</b><br>[% w/v]        | 0,004               | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     |
| <b>Succinat-</b><br><b>puffer [mM]</b> | <b>10</b>           | <b>10</b> | <b>10</b> | <b>10</b> | <b>10</b> | <b>10</b> | <b>10</b> | <b>10</b> | <b>10</b> |
| <b>pH</b>                              | 4,00                | 4,25      | 4,50      | 4,75      | 5,00      | 5,25      | 5,50      | 5,75      | 6,00      |

**Tabelle 3: G-CSF-haltige Formulierung mit 5 mM Succinatpuffer**

|  | <b>Formulierung</b> |           |           |           |           |           |           |           |           |
|--|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|  | <b>19</b>           | <b>20</b> | <b>21</b> | <b>22</b> | <b>23</b> | <b>24</b> | <b>25</b> | <b>26</b> | <b>27</b> |
| <b>Substanz</b>                        |                     |           |           |           |           |           |           |           |           |
| <b>G-CSF</b><br>[mg/ml]                | 0,3                 | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       |
| <b>Mannit</b><br>[% w/v]               | 0,5                 | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       |
| <b>Polysorbat-80</b><br>[% w/v]        | 0,004               | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     |
| <b>Succinat-</b><br><b>puffer [mM]</b> | <b>5</b>            | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  |
| <b>pH</b>                              | 4,00                | 4,25      | 4,50      | 4,75      | 5,00      | 5,25      | 5,50      | 5,75      | 6,00      |

**Tabelle 4: G-CSF-haltige Formulierung mit 20 mM Tartratpuffer**

|                                 | <b>Formulierung</b> |           |           |           |           |           |           |           |           |
|---------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                 | <b>28</b>           | <b>29</b> | <b>30</b> | <b>31</b> | <b>32</b> | <b>33</b> | <b>34</b> | <b>35</b> | <b>36</b> |
| <b>Substanz</b>                 |                     |           |           |           |           |           |           |           |           |
| <b>G-CSF</b><br>[mg/ml]         | 0,3                 | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       |
| <b>Mannit</b><br>[% w/v]        | 0,5                 | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       |
| <b>Polysorbat-80</b><br>[% w/v] | 0,004               | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     |
| <b>Tartratpuffer</b><br>[mM]    | 20                  | 20        | 20        | 20        | 20        | 20        | 20        | 20        | 20        |
| <b>pH</b>                       | 4,00                | 4,25      | 4,50      | 4,75      | 5,00      | 5,25      | 5,50      | 5,75      | 6,00      |

**Tabelle 5: G-CSF-haltige Formulierung mit 10 mM Tartratpuffer**

|                                 | <b>Formulierung</b> |           |           |           |           |           |           |           |           |
|---------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                 | <b>37</b>           | <b>38</b> | <b>39</b> | <b>40</b> | <b>41</b> | <b>42</b> | <b>43</b> | <b>44</b> | <b>45</b> |
| <b>Substanz</b>                 |                     |           |           |           |           |           |           |           |           |
| <b>G-CSF</b><br>[mg/ml]         | 0,3                 | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       |
| <b>Mannit</b><br>[% w/v]        | 0,5                 | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       |
| <b>Polysorbat-80</b><br>[% w/v] | 0,004               | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     |
| <b>Tartratpuffer</b><br>[mM]    | 10                  | 10        | 10        | 10        | 10        | 10        | 10        | 10        | 10        |
| <b>pH</b>                       | 4,00                | 4,25      | 4,50      | 4,75      | 5,00      | 5,25      | 5,50      | 5,75      | 6,00      |



**Tabelle 6: G-CSF-haltige Formulierung mit 5 mM Tartratpuffer**

|                                 | <b>Formulierung</b> |           |           |           |           |           |           |           |           |
|---------------------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                 | <b>46</b>           | <b>47</b> | <b>48</b> | <b>49</b> | <b>50</b> | <b>51</b> | <b>52</b> | <b>53</b> | <b>54</b> |
| <b>Substanz</b>                 |                     |           |           |           |           |           |           |           |           |
| <b>G-CSF</b><br>[mg/ml]         | 0,3                 | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       | 0,3       |
| <b>Mannit</b><br>[% w/v]        | 0,5                 | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       | 0,5       |
| <b>Polysorbat-80</b><br>[% w/v] | 0,004               | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     | 0,004     |
| <b>Tartratpuffer</b><br>[mM]    | <b>5</b>            | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  | <b>5</b>  |
| <b>pH</b>                       | 4,00                | 4,25      | 4,50      | 4,75      | 5,00      | 5,25      | 5,50      | 5,75      | 6,00      |

- 500 µl der hergestellten Zusammensetzungen wurden in Eppendorfröhrchen bei  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  und  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  8 Wochen lang inkubiert. Als Vergleich dienten eine G-CSF-haltige Formulierung mit 0,3 mg/ml G-CSF in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,0, mit 0,5% (w/v) Mannit und 0,004 % (w/v) Polysorbat-80, sowie eine Formulierung mit 0,3 mg/ml G-CSF in 10 mM Phosphatpuffer, pH 4,0, 5,0 und 7,5, mit 0,5% (w/v) Mannit und 0,004 % (w/v) Polysorbat-80.
- 10 Während der Inkubation wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und hinsichtlich ihres Restgehalts an chemisch unmodifiziertem monomerem G-CSF und hinsichtlich der biologischen Aktivität von G-CSF analysiert. Ein hoher Restgehalt an monomerem G-CSF und/oder eine im Wesentlichen gleich bleibende biologische Aktivität des G-CSF-Proteins zeigen
- 15 an, dass an dem Protein keine oder nur geringe chemische Veränderungen erfolgt sind.

Die Bestimmung des Restgehalts von chemisch unmodifiziertem monomerem G-CSF erfolgte mittels Reverse Phase-Hochleistungschromatographie (RP-HPLC) mit einer C4 Vydac-Säule. Die mobile Phase enthielt mit Trifluoressigsäure (TFA) angesäuertes Wasser als Eluens A und mit TFA  
5 angesäuertes Acetonitril als Eluens B. Die Chromatographie wurde 1 Stunde bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,2 ml/min mit einem linearen Gradienten von A und B durchgeführt. Das Einspritzvolumen betrug 5 µl. Die Detektionswellenlänge war 206 nm und die Auswertung erfolgte mit einer bekannten G-CSF-Verdünnung als externem Standard. Der Restgehalt an  
10 G-CSF wurde entsprechend der Methode von Herman, A.C. (a.a.O.) als % Peakfläche (PA) des Anfangsgehalts an monomerem G-CSF an Tag 0 bestimmt, die als 100 % definiert wurde.

Der Nachweis der Stabilisierung von G-CSF durch die Bestimmung der biologischen Aktivität von G-CSF nach Langzeitinkubation erfolgte mittels eines  
15 NFS-60-Bioassays (Tohyama, K. et al., Japanese J. Cancer Res. 80:335-340, 1989). Hierbei wurde die G-CSF-Aktivität festgestellt, indem die Induktion der Zellproliferation als Reaktion auf verschiedene Konzentrationen von G-CSF gemessen wurde. Die Proliferation der NFS-60-Zellen wurde durch Bestimmung  
20 der Dehydrogenase-Aktivität verfolgt. Dehydrogenase reduziert 3-(4,5-Dimethylthiatholyl-2)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan, welches photometrisch bei einer Detektionswellenlänge von 570 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen werden kann. Die Dehydrogenase-Aktivität und damit die Menge gebildetes Formazan korrelieren  
25 direkt mit der Zellzahl der NFS-60-Zellen.

Die erhaltenen Ergebnisse werden nachfolgend beschrieben.

### **Restgehalt von G-CSF nach Inkubation bei 25°C in Formulierungen mit Succinatpuffer**

Die Analyse der bei 25°C inkubierten Zusammensetzungen 1 bis 27 (Tabelle 1-3; Fig. 1-3) mittels RP-HPLC nach 4 und 8 Wochen Inkubation zeigte, dass der Gehalt an G-CSF verglichen mit dem Anfangsgehalt der Zusammensetzungen in 20, 10 und 5 mM Succinatpuffer auch noch nach 8 Wochen Inkubation bei 25°C sehr hoch war. Die Stabilität von G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen ist vergleichbar mit der Stabilität von G-CSF in einer herkömmlichen Formulierung mit 10 mM Acetat, pH 4,0, jedoch bei deutlich höheren pH-Werten. Die Figuren 1 bis 3 zeigen repräsentative Beispiele für Formulierungen mit Succinatpuffer bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich mit einer herkömmlichen Acetat-Formulierung bei pH 4,0. Figur 1 zeigt den Gehalt von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 20 mM Succinatpuffer bei pH 4,5, 5,0 und 6,0. Figur 2 zeigt den Gehalt von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 10 mM Succinatpuffer bei pH 4,0, 4,5, 5,0 und 6,0. Figur 3 zeigt den Gehalt von G-CSF zu Beginn des Experiments und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 5 mM Succinatpuffer bei pH 4,0, 4,5, 5,5 und 6,0.

Bei Inkubation bei 4°C verhielten sich acetat- und succinat-/tartratgepufferte G-CSF-Lösungen in den beschriebenen pH-Bereichen vergleichbar (Werte nicht gezeigt).

### **Restgehalt von G-CSF nach Inkubation bei 25°C in Formulierungen mit Tartratpuffer**

Die Analyse der bei 25°C inkubierten Zusammensetzungen 28 bis 54 (Tabelle 4-6, Fig. 4-6) mittels RP-HPLC nach 4 und 8 Wochen Inkubation zeigte, dass der Gehalt an G-CSF verglichen mit dem Anfangsgehalt der Zusammensetzungen in 20, 10 und 5 mM Tartratpuffer auch noch nach 8

Wochen Inkubation bei 25°C sehr hoch war. Auch in diesem Fall ist die Stabilität von G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen vergleichbar mit der Stabilität von G-CSF in einer herkömmlichen Formulierung mit 10 mM Acetat, pH 4,0. Die Figuren 4 bis 6 zeigen repräsentative Beispiele für Formulierungen mit Tartratpuffer bei verschiedenen pH-Werten im Vergleich mit einer herkömmlichen Acetat-Formulierung bei pH 4,0. Figur 4 zeigt den Gehalt von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 20 mM Tartratpuffer bei pH 4,0, 5,0, 5,5 und 6,0. Figur 5 zeigt den Gehalt von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 10 mM Tartratpuffer bei pH 4,5, 5,5 und 6,0. Figur 6 zeigt den Gehalt von G-CSF zu Beginn des Experiments (100 %) und nach 4 und 8 Wochen Inkubation in 5 mM Tartratpuffer bei pH 4,0, 4,5, 5,5 und 6,0.

Bei Inkubation bei 4°C verhielten sich acetat- und succinat-/tartratgepufferte G-CSF-Lösungen in den beschriebenen pH-Bereichen vergleichbar (Werte nicht gezeigt).

#### **Restgehalt von G-CSF nach Inkubation bei 37°C in verschiedenen Puffern**

In einem weiteren Versuch wurde die Langzeitstabilität von G-CSF bei 37°C in 10 mM Succinat- und Tartratpuffer, pH 5,0 (Formulierungen 58 und 59), in 10 mM Acetatpuffer, pH 4,0 (Formulierung 60), sowie in 10 mM Phosphatpuffer, pH 4,5, 5,0 und 7,5 (Formulierungen 55-57), bestimmt (Tabelle 7). Der Gehalt von monomerem G-CSF, der wie in den vorhergehenden Versuchen mittels RP-HPLC bestimmt wurde, ist in den Figuren 7 und 8 graphisch dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Gehalt von G-CSF in den Formulierungen mit Succinat- und Tartratpuffer auch noch nach 90 Tagen Inkubation mit dem Gehalt vergleichbar ist, der in 10 mM Acetat, pH 4,0, beobachtet wird. Dagegen nimmt der G-CSF-Gehalt in den Formulierungen mit 10 mM Phosphatpuffer bei pH 5,0 bereits nach 13 Tagen drastisch ab und ist nach 20 Tagen vernachlässigbar gering.

**Tabelle 7: G-CSF-haltige Formulierung in 10 mM Phosphat-, Succinat-, Tartrat- und Acetatpuffer**

|                            | <b>Formulierung</b> |       |       |       |       |       |
|----------------------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                            | 55                  | 56    | 57    | 58    | 59    | 60    |
| <b>Substanz</b>            |                     |       |       |       |       |       |
| G-CSF<br>[mg/ml]           | 0,3                 | 0,3   | 0,3   | 0,3   | 0,3   | 0,3   |
| Mannit<br>[% w/v]          | 0,5                 | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5   |
| Polysorbat-80<br>[% w/v]   | 0,004               | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| Inkubationsdauer<br>[Tage] | 20                  | 20    | 20    | 90    | 90    | 90    |
| Phosphatpuffer<br>[mM]     | 10                  | 10    | 10    | -     | -     | -     |
| Succinatpuffer<br>[mM]     | -                   | -     | -     | 10    | -     | -     |
| Tartratpuffer<br>[mM]      | -                   | -     | -     | -     | 10    | -     |
| Essigsäure<br>[mM]         | -                   | -     | -     | -     | -     | 10    |
| pH                         | 4,5                 | 5,0   | 7,5   | 5,0   | 5,0   | 4,0   |

**Biologische Aktivität von G-CSF nach Inkubation bei 25°C und Bei 37°C in Succinat- und Tartratpuffern**

Die Analyse einiger repräsentativer Formulierungen (3, 4, 5, 13, 14, 23, 32 und 41 der Tabellen 1 bis 6), welche bei 25°C und 37°C eingelagert wurden, mit dem weiter oben unter 2.2 beschriebenen Bioassay zeigt, dass die biologische Aktivität von G-CSF-Formulierungen mit den erfindungsgemäßen Puffersubstanzen Succinat oder Tartrat bei verschiedenen Konzentrationen (5 bis 20 mM) und bei verschiedenen pH-Werten (pH 4,5 bis pH 5,5) auch unter Stressbedingungen von 25°C und 37°C noch nach 90 Tagen Inkubation zwischen 80 und 120 % der anfänglichen Aktivität liegt (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Biologische Aktivität von G-CSF-Formulierungen**

|   | Formulierung |      |     |      |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---|--------------|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | 3            | 4    | 5   | 13   | 14  | 23  | 5   | 14  | 32  | 34  | 32  | 41  |
| Inkubations-<br>temperatur<br>[°C]                          | 25           | 25   | 25  | 25   | 25  | 25  | 37  | 37  | 25  | 25  | 37  | 37  |
| Inkubations-<br>dauer<br>[Tage]                             | 60           | 60   | 90  | 60   | 90  | 90  | 40  | 90  | 70  | 70  | 30  | 90  |
| Succinatpuffer<br>[mM]                                      | 20           | 20   | 20  | 10   | 10  | 5   | 20  | 10  | -   | -   | -   | -   |
| Tartratpuffer<br>[mM]                                       | -            | -    | -   | -    | -   | -   | -   | -   | 20  | 20  | 20  | 10  |
| pH  | 4,5          | 4,75 | 5,0 | 4,75 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,5 | 5,0 | 5,0 |
| Biologische<br>Aktivität relativ<br>zur Zeit 0<br>[80-120%] | +            | +    | +   | +    | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |

Die oben beschriebenen Versuche zeigen, dass die Stabilität von G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen auch bei pH-Werten, die nahe den physiologischen pH-Werten liegen, über lange Zeit und bei Temperaturen bis mindestens 37°C stabil sind. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit Formulierungen in 10 mM Acetat, pH 4,0 und deutlich besser als bei Formulierungen mit 10 mM Phosphatpuffer mit pH 5,0 und 7,5.

## 2. Stabilität von G-CSF-Formulierungen nach mechanischer Belastung

G-CSF-haltige Zusammensetzungen wurden wie in Beispiel 1 beschrieben bei Raumtemperatur hergestellt, indem die Puffersubstanzen Succinat und Tartrat in Form der Dinatriumsalze, gegebenenfalls zusammen mit einem Tensid (Polysorbat-20 oder Polysorbat-80) und einem isotonisierenden Mittel (Mannit oder Sorbit), zunächst in destilliertem und sterilem Wasser gelöst wurden und anschließend der pH-Wert mit Succinat- oder Tartratpuffer auf den gewünschten Wert eingestellt wurde. Im Handel erhältlicher, nicht-glykosylierter

rekombinanter humaner G-CSF wurde nach Filtration durch ein Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm, Millipore®) zugegeben.

- 5 500 µl-Proben der hergestellten Zusammensetzungen wurden in SCF-Fertigspritzen (Becton Dickinson, Grenoble, Frankreich) aufgezogen und auf einem Vortex®-Gerät zur Ausübung von mechanischem Stress 10 sec bei Raumtemperatur geschüttelt.

- 10 Die Überprüfung der G-CSF-Zusammensetzungen auf Aggregatbildung nach dem Schütteln erfolgte mittels Größenausschlußchromatographie (SEC) mit einem Agilent Series 1100-Gerät an einer BioSep SEC S2000-Säule (7,8 x 300 mm, 5µm) der Firma Phenomenex. Als Eluens wurde 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, eingesetzt, der 50 mM NaCl enthielt. Die Analyse erfolgte isokratisch bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,4 ml/min innerhalb von 45 min und  
15 bei einer Säulentemperatur von 20°C. Das Injektionsvolumen lag zwischen 15 und 25 µl, entsprechend einer Proteinmenge von 15 µg. Die Detektionswellenlänge betrug 214 nm und die Größenauswertung erfolgte mittels eines Gelfiltrationsstandards der Firma Biorad (BioRad Art.-Nr. 151-1901) durch Auftragen des Molekulargewichts über dem Elutionsvolumen.  
20 Die Aggregatbildung, ausgedrückt in %, gibt den Gehalt an Dimer und höheren Aggregaten von G-CSF in der Probe an, bezogen auf den Anfangsgehalt an monomerem G-CSF vor mechanischer Belastung, und ergibt sich aus den Peakflächen für das Monomer und die auftretenden Aggregate.

- 25 Die Probenzusammensetzungen und die Ergebnisse der Tests sind in der nachfolgenden Tabelle 9 angegeben. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von jeweils drei Versuchen dar.

**Tabelle 9: Aggregatbildung von G-CSF-Formulierungen bei mechanischem Stress**

|   | <b>Formulierung</b>   | <b>Aggregatbildung [%]</b> |
|---|---|----------------------------|
| 1 | 10 mM Succinatpuffer<br>pH 5,0<br>0,02 % (w/v) Tween 20<br>5 % (w/v) D-Sorbit | 0,1 - 0,2                  |
| 2 | 10 mM Acetatpuffer<br>pH 4,0<br>0,004 % (w/v) Tween 80<br>5 % (w/v) D-Sorbit  | 1 – 2                      |

Die Ergebnisse zeigen, dass die succinatgepufferte Formulierung selbst bei höheren Temperaturen und einem pH-Wert von 5,0 nach mechanischer Belastung weniger Aggregatbildung aufweist als die acetatgepufferte Formulierung. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verhalten sich also gegenüber mechanischem Stress stabiler als herkömmliche Zusammensetzungen.

### 3. Stabilität von G-CSF-Formulierungen nach Einfrieren und Auftauen

#### 3.1 Stabilität niedrigkonzentrierter Zusammensetzungen

Es wurden G-CSF-haltige Zusammensetzungen mit einer G-CSF-Konzentration von 0,6 mg/ml hergestellt. Die Herstellung erfolgte wie in Beispiel 2 beschrieben.

Für den Stabilitätstest wurden 500 µl-Proben der hergestellten Zusammensetzungen einem einmaligen Einfrier/Auftauzyklus unterworfen, indem die Proben bei -70°C über Nacht eingefroren und am nächsten Tag bei



20°C aufgetaut wurden. Nach dem Auftauen wurden die Proben sofort wie in Beispiel 2 beschrieben mittels SEC auf ihren Restgehalt an monomerem G-CSF analysiert.

- 5 Die Ergebnisse der Tests sind in der nachfolgenden Tabelle 10 angegeben. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von 3 Tests dar.

**Tabelle 10: Restgehalt an monomerem G-CSF in gepufferten G-CSF-Formulierungen nach Einfrieren und Auftauen**

|   | <b>Formulierung</b>   | <b>Restgehalt Monomer [%]</b> |
|---|---|-------------------------------|
| 1 | 10 mM Succinatpuffer<br>pH 5,0<br>0,02 % (w/v) Tween 20<br>5 % (w/v) D-Sorbit | 100 ± 2                       |
| 2 | 10 mM Succinatpuffer<br>pH 5,0  | 99 ± 2                        |
| 3 | 10 mM Acetatpuffer<br>pH 4,2<br>0,004 % (w/v) Tween 80<br>5 % (w/v) D-Sorbit  | 50 ± 5                        |

### 3.2 Stabilität hochkonzentrierter Zusammensetzungen

- 10 G-CSF-haltige Zusammensetzungen wurden entsprechend Beispiel 3.1 hergestellt, außer dass die G-CSF-Konzentration 3,0 mg/ml betrug.

- 15 Der Stabilitätstest wurde wie in Beispiel 3.1 beschrieben durchgeführt, außer dass für den Einfrier/Auftauzyklus 1000 µl-Proben der hergestellten Zusammensetzungen verwendet wurden. Nach dem Auftauen wurden die Proben wie in Beispiel 2 beschrieben einer SEC unterworfen und der Gehalt an G-CSF-Dimeren und höheren Aggregaten in der Probe wurde bestimmt und in

%, bezogen auf den Anfangsgehalt an monomerem G-CSF in der Probe, angegeben.

Die Ergebnisse der Tests sind in der nachfolgenden Tabelle 11 angegeben. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte von 3 Tests dar.

**Tabelle 11: Aggregatbildung von G-CSF in gepufferten Formulierungen nach einmaligem Einfrieren und Auftauen**

|   | Formulierung                    | Aggregatgehalt [%] |
|---|---------------------------------|--------------------|
| 1 | 20 mM Succinatpuffer<br>pH 4,25 | 0,1 -0,13          |
| 2 | 20 mM Succinatpuffer<br>pH 5,0  | 0,1-0,2            |
| 3 | 20 mM Acetatpuffer<br>pH 4,0    | 45 ± 5             |

Die Bildung von Dimeren und höheren Aggregaten wurde auch mittels isoelektrischer Fokussierung verifiziert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass succinatgepufferte G-CSF-Formulierungen G-CSF auch bei pH-Werten über 4,0 nach einem Einfrier-/Auftauzyklus noch in nahezu unveränderter Form enthalten, während der Gehalt an monomerem G-CSF in acetatgepufferten Formulierungen stark abnimmt. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen verhalten sich also gegenüber Einfrier-/Auftauzyklen deutlich stabiler als herkömmliche Zusammensetzungen.

15

Insgesamt zeigen die obigen Versuche, dass G-CSF in den erfindungsgemäßen Zusammensetzungen auch bei pH-Werten, die nahe den physiologischen pH-Werten liegen, über lange Zeit und bei Temperaturen bis mindestens 37°C stabil sind. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen eignen sich daher beispielsweise sehr gut für den Einsatz als Injektionslösungen, mit denen sich wegen des physiologischen pH-Werts

20

Hautirritationen verhindern lassen. Die Anwesenheit von Succinat und/oder Tartrat verhindert ferner unerwünschte Reaktionen von G-CSF bei der Rekonstitution des Proteins, beispielsweise beim Auflösen. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind außerdem gegenüber

5 mechanischer Belastung stabil, so dass solche Formulierungen nicht nur problemlos filtriert, in Ampullen abgefüllt oder in Spritzen aufgezogen werden können, sondern sich auch gefahrlos über längere Strecken transportieren lassen. Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen sind auch gegenüber

10 wiederholtem Einfrieren und Auftauen stabil, wodurch die Haltbarkeit der G-CSF-Formulierungen noch weiter verlängert werden kann.

### Patentansprüche

1. Wässrige G-CSF-haltige Zusammensetzung, welche als  
5 Puffersubstanzen Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure  
und/oder eines Salzes davon, umfasst,  
  
ausgenommen Zusammensetzungen mit einer Tartratkonzentration von  
weniger als 2 mM und einem pH-Wert von  $\leq 4,0$ , die kein Succinat als  
10 Puffersubstanz enthalten.
2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei der pH-Wert der  
Zusammensetzung zwischen 3,5 und 6,0, bevorzugt zwischen 4,0 und  
5,8, und besonders bevorzugt zwischen 4,5 und 5,5 liegt.  
15
3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Salz der  
Bernsteinsäure und/oder der Weinsäure ausgewählt ist aus Alkali-,  
Erdalkali- oder Ammoniumsalzen.
- 20 4. Zusammensetzung nach Anspruch 3, wobei das Salz der Bernsteinsäure  
und/oder der Weinsäure das Di-Natriumsalz ist.
5. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei  
Succinat und/oder Tartrat in einer Konzentration von 0,5 bis 150 mM,  
25 vorzugsweise von 1 bis 100 mM und besonders bevorzugt von 1 bis  
50 mM vorliegen.
6. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 5, wobei  
G-CSF in einer Konzentration von 0,0001 bis 5 mg/ml, insbesondere von  
30 0,0005 bis 4 mg/ml und bevorzugt von 0,01 bis 1,5 mg/ml vorliegt.

7. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, welche ferner ein oder mehrere weitere Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und Zusatzstoffe umfasst, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tensiden, isotonisierenden Mitteln, Aminosäuren, Reduktionsmitteln, Antioxidantien, Komplexbildnern und chaotropen Agenzien.  
5
8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das Tensid ein nichtionisches Tensid ist, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Polyoxyethylensorbitanmonolaureat, Polyoxyethylensorbitanmonooleat, Polyoxyethylensorbitanmonostearat, Polyoxyethylensorbitanmonopalmitat, Polyoxyethylensorbitantrioleat und Polyoxyethylensorbitantristearat.  
10
9. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei der Komplexbildner Citrat ist.  
15
10. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das isotonisierende Mittel Mannit und/oder Sorbit ist.  
20
11. Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 10 als pharmazeutisches Präparat.
12. Zusammensetzung nach Anspruch 11, wobei das pharmazeutische Präparat eine Injektions- oder Infusionslösung ist.  
25
13. Lyophilisat oder Pulver, umfassend G-CSF sowie Succinat und/oder Tartrat in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon.
14. Lyophilisat oder Pulver nach Anspruch 13, wobei das Salz der Bernsteinsäure und/oder der Weinsäure ausgewählt ist aus Alkali-, Erdalkali- oder Ammoniumsalzen.  
30

15. Lyophilisat oder Pulver nach irgendeinem der Ansprüche 13 oder 14, wobei das Salz der Bernsteinsäure und/oder der Weinsäure das Di-Natriumsalz ist.
- 5
16. Lyophilisat oder Pulver nach irgendeinem der Ansprüche 13 bis 15, welches ferner ein oder mehrere weitere Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und Zusatzstoffe umfasst, insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tensiden, isotonisierenden Mitteln, Aminosäuren, Reduktionsmitteln, Antioxidantien, Komplexbildnern und chaotropen Agenzien.
- 10
17. Lyophilisat oder Pulver nach Anspruch 16, wobei der Komplexbildner Citrat ist.
- 15
18. Lyophilisat oder Pulver nach irgendeinem der Ansprüche 13 bis 17, erhältlich durch Lyophilisieren bzw. Sprühtrocknen einer wässrigen G-CSF-haltigen Zusammensetzung, welche als Puffersubstanzen Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfasst.
- 20
19. Arzneimittel-Kit, umfassend räumlich voneinander getrennt:
- 25
- a) ein G-CSF-haltiges Lyophilisat oder Pulver; und
- b) ein wässriges Lösungsmittel, welches Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfasst.
- 30
20. Arzneimittel-Kit, nach Anspruch 19, wobei das G-CSF-haltige Lyophilisat oder Pulver Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, umfasst.

21. Arzneimittel-Kit, nach Anspruch 19 oder 20, wobei das Lyophilisat oder  
Pulver und/oder das wässrige Lösungsmittel ferner ein oder mehrere  
weitere Stabilisierungsmittel und/oder Hilfs- und Zusatzstoffe umfassen,  
insbesondere ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Tensiden,  
isotonisierenden Mitteln, Aminosäuren, Reduktionsmitteln,  
Antioxidantien, Komplexbildnern und chaotropen Agenzien.
22. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach irgendeinem  
der Ansprüche 1 bis 12, welches das Lösen von G-CSF in einem  
wässrigen Lösungsmittel umfasst, welches Succinat und/oder Tartrat, in  
Form der freien Säure und/oder eines Salzes davon, als  
Puffersubstanzen umfasst.
23. Verfahren zur Herstellung eines Lyophilisats oder eines Pulvers nach  
irgendeinem der Ansprüche 13 bis 18, welches das Lyophilisieren oder  
die Sprühtrocknung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der  
Ansprüche 1 bis 10 umfasst.
24. Verwendung von Succinat und/oder Tartrat, in Form der freien Säure  
und/oder eines Salzes davon, zur Stabilisierung von G-CSF.
25. Verwendung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche  
1 bis 10 oder eines Lyophilisats oder Pulvers nach irgendeinem der  
Ansprüche 13 bis 18 zur Herstellung pharmazeutischer Präparate.
26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei die pharmazeutischen Präparate  
Hydrogele oder Liposomen umfassen.

Fig. 1

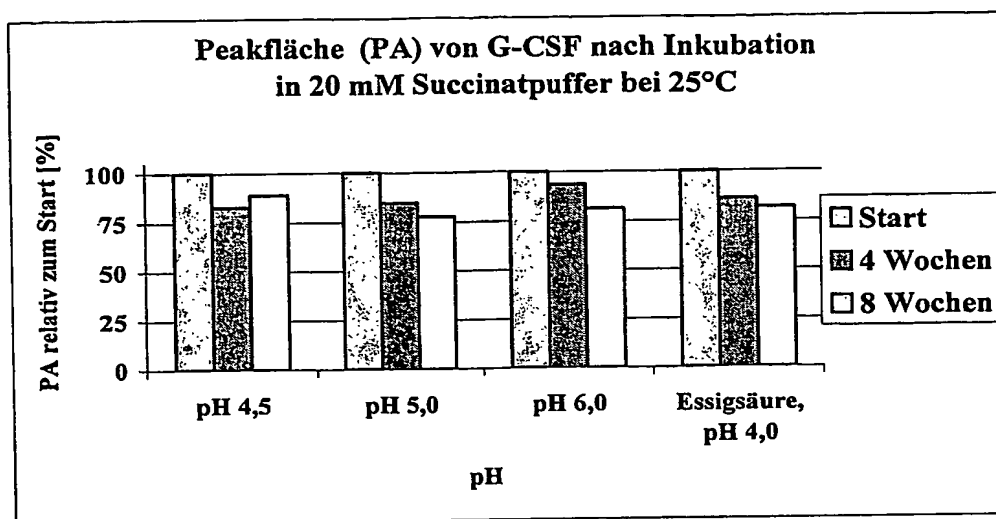


Fig. 2

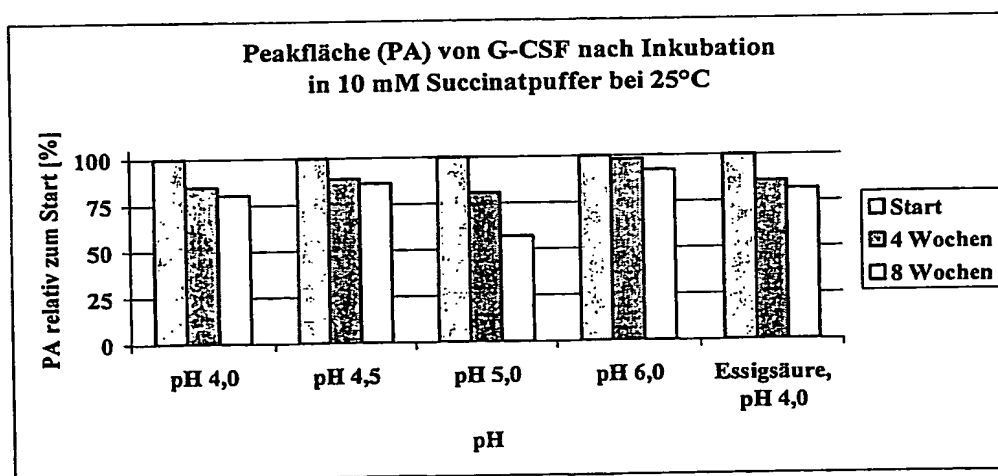




Fig. 3

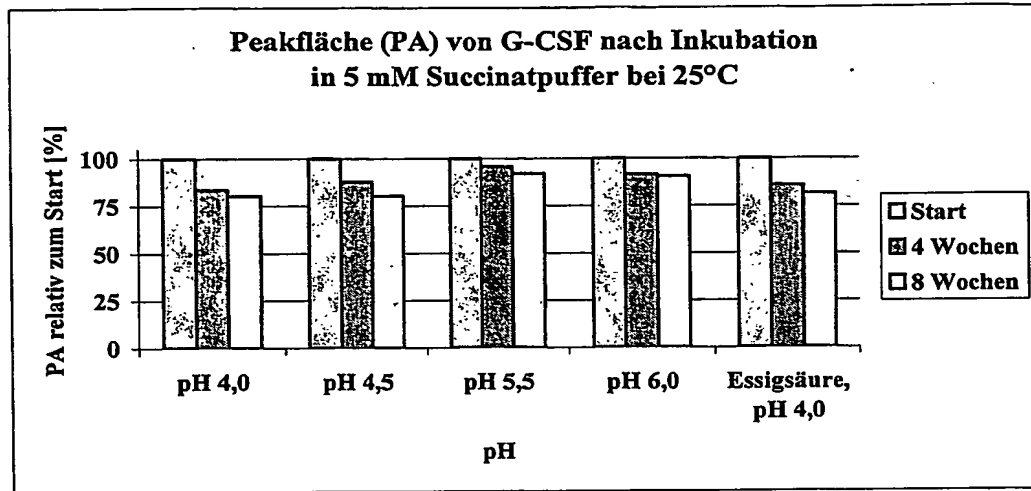


Fig. 4

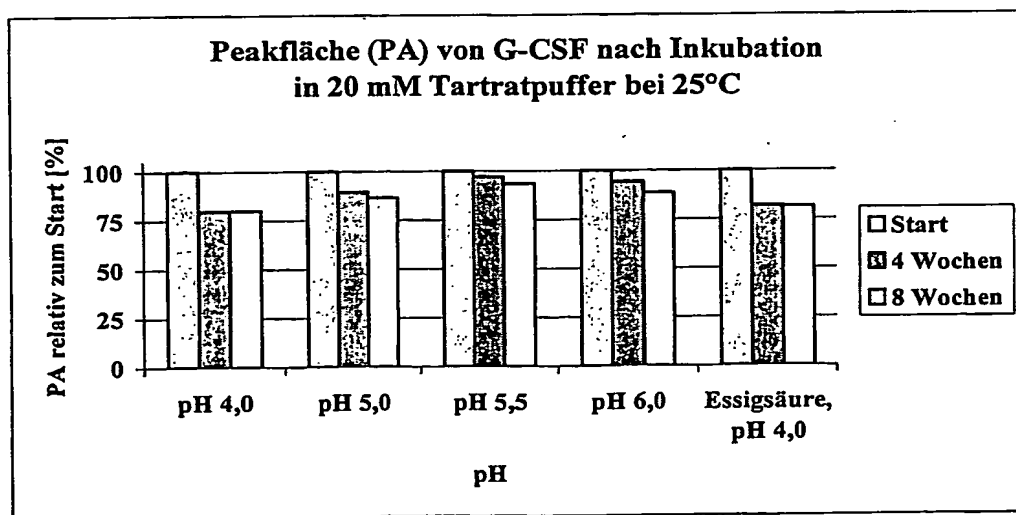


Fig. 5

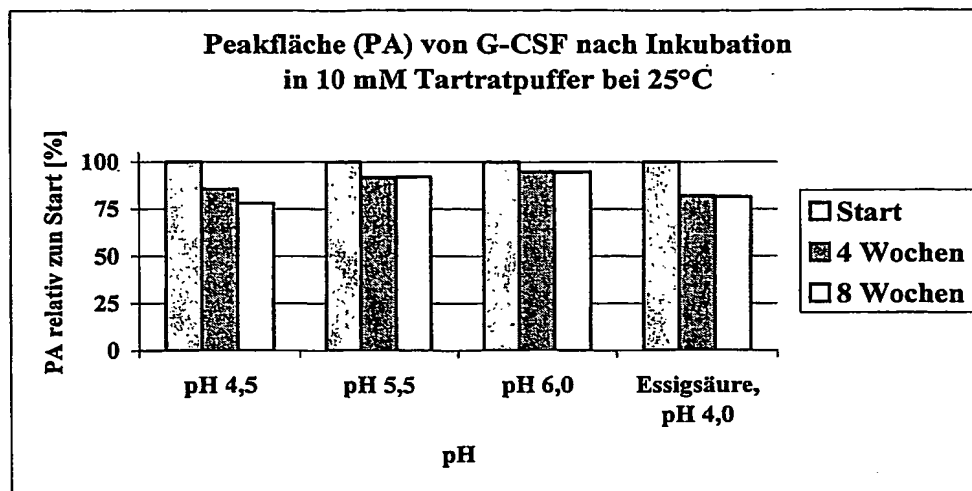


Fig. 6

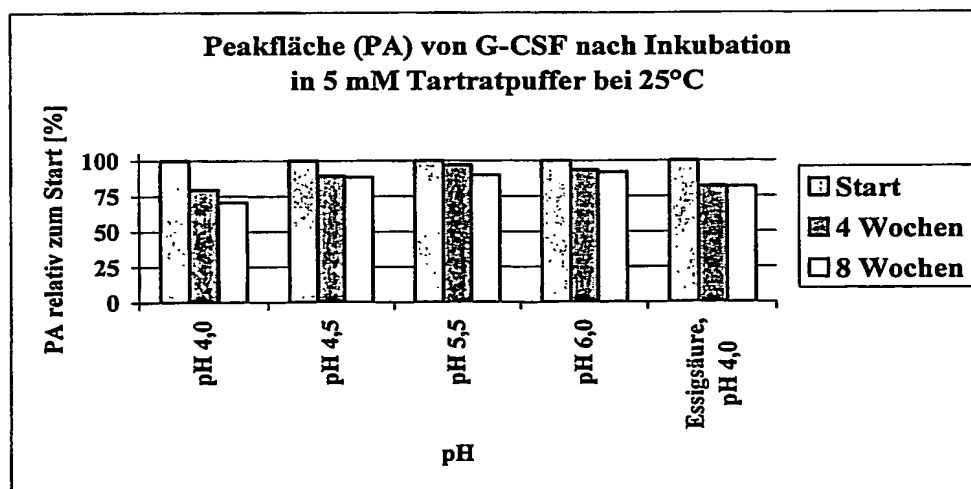


Fig. 7

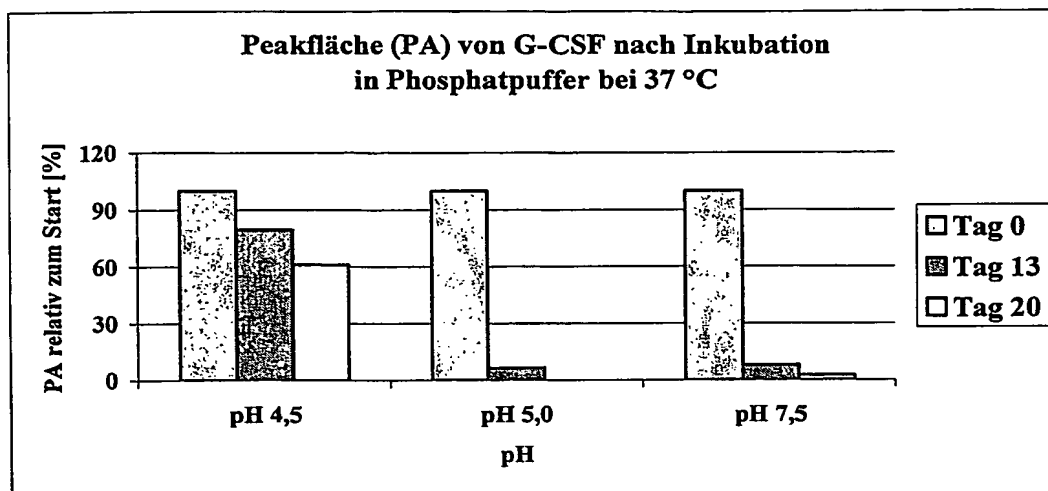
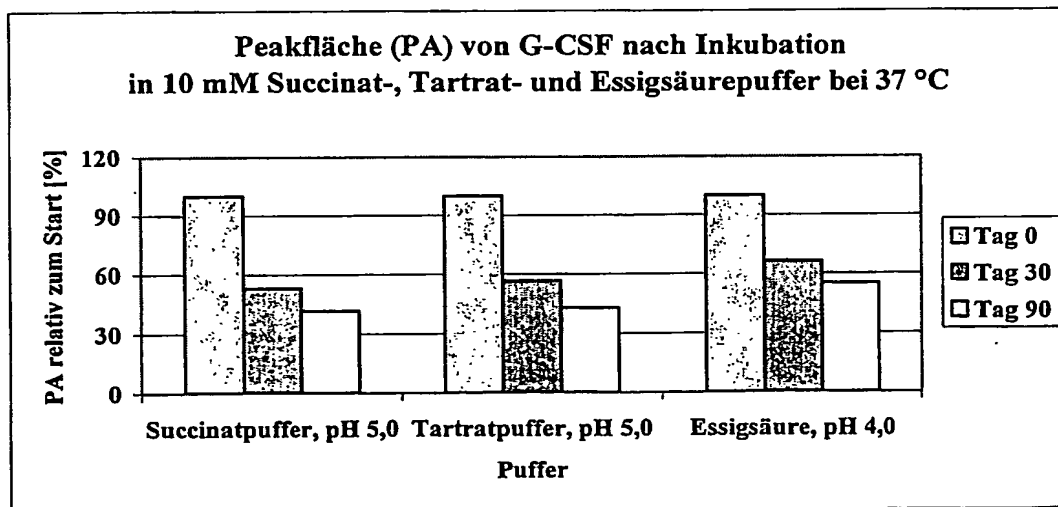


Fig. 8



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int onal Application No  
PC I/EP2004/011875

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K38/19 A61K47/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | EP 0 373 679 A (AMGEN INC)<br>20 June 1990 (1990-06-20)<br>cited in the application<br>page 2<br>page 3, line 1 - line 30<br>page 4   | 1-26                  |
| X          | US 5 919 443 A (MICHAELIS ET AL)<br>6 July 1999 (1999-07-06)<br>cited in the application<br>column 2, line 56 - column 5, line 30<br>column 6, line 14 - line 19<br>-----<br>-/-- | 1-26                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 February 2005

Date of mailing of the international search report

10/03/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hars, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int — nal Application No  
 PCT/EP2004/011875

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | US 5 597 562 A (NOMURA ET AL)<br>28 January 1997 (1997-01-28)<br>column 1, line 11 - line 14<br>column 2, line 57 - line 63<br>column 3, line 54 - column 5, line 10<br>column 6, line 5 - line 14<br>-----  | 1-26                  |
| X          | US 6 162 427 A (BAUMANN ET AL)<br>19 December 2000 (2000-12-19)<br>column 2, line 55 - line 65<br>-----  | 1-26                  |
| X          | US 5 350 741 A (TAKADA ET AL)<br>27 September 1994 (1994-09-27)<br>example 1<br>-----  | 1-26                  |
| X          | NOMURA H ET AL: "EFFECT OF A DOSING<br>SOLUTION ON THE NASAL ABSORPTION OF<br>NON-GLYCOSYLATED RECOMBINANT HUMAN<br>GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR IN<br>RATS"<br>BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF<br>JAPAN), PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN,<br>JP,<br>vol. 19, no. 11,<br>1 November 1996 (1996-11-01), pages<br>1490-1493, XP000636230<br>ISSN: 0918-6158<br>abstract<br>table 3<br>----- | 1-26                  |
| X          | USHIROGAWA Y ET AL: "EFFECT OF ORGANIC<br>ACIDS TRYPSIN INHIBITORS AND DIETARY<br>PROTEIN ON THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF<br>RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE<br>COLONY-STIMULATING FACTOR RHG-CSF IN RATS"<br>INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS<br>(KIDLINGTON),<br>vol. 81, no. 2-3, 1992, pages 133-141,<br>XP002319194<br>ISSN: 0378-5173<br>abstract<br>page 134<br>-----                          | 1-26                  |
| A          | US 5 919 757 A (MICHAELIS ET AL)<br>6 July 1999 (1999-07-06)<br>cited in the application<br>column 1, line 8 - line 16<br>column 5, line 35 - line 37<br>table 1<br>claims 4-7<br>-----  | 1-26                  |

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP2004/011875

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | US 5 078 997 A (HORA ET AL)<br>7 January 1992 (1992-01-07)<br>column 1 - column 2<br>column 5, line 7 - line 17<br>column 6, line 1 - line 42<br>-----              | 1-26                  |
| A          | US 5 151 265 A (HWANG-FELGNER ET AL)<br>29 September 1992 (1992-09-29)<br>column 1, line 22 - line 52<br>column 2, line 15 - line 40<br>example 1; table 1<br>----- | 1-26                  |
| A          | US 4 675 184 A (HASEGAWA ET AL)<br>23 June 1987 (1987-06-23)<br>column 1, line 8 - line 9<br>column 2, line 18 - line 30<br>example 3; table 8<br>-----             | 1-26                  |
| A          | US 2003/180253 A1 (CHEN BAO-LU ET AL)<br>25 September 2003 (2003-09-25)<br>paragraphs '0070!, '0082! - '0084!,<br>'0109!, '0116!, '0118!<br>-----                   | 1-26                  |
| A          | EP 0 229 016 A (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI<br>KAISHA; BIOGEN N.V)<br>15 July 1987 (1987-07-15)<br>page 2, line 1 - page 3, line 44<br>tables 1,2<br>-----           | 1-26                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int — 1st Application No

PCT/EP2004/011875

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0373679                                | A | 20-06-1990          | US 5104651 A               | 14-04-1992          |
|   |   |                     | AT 107513 T                | 15-07-1994          |
|   |   |                     | AU 621695 B2               | 19-03-1992          |
|   |   |                     | AU 4668989 A               | 10-07-1990          |
|   |   |                     | CA 2005143 A1              | 16-06-1990          |
|   |   |                     | DE 68916385 D1             | 28-07-1994          |
|   |   |                     | DE 68916385 T2             | 13-10-1994          |
|   |   |                     | EP 0373679 A2              | 20-06-1990          |
|   |   |                     | ES 2055001 T3              | 16-08-1994          |
|   |   |                     | HK 1006812 A1              | 19-03-1999          |
|   |   |                     | JP 2888969 B2              | 10-05-1999          |
|   |   |                     | JP 3502808 T               | 27-06-1991          |
|   |   |                     | WO 9006762 A1              | 28-06-1990          |
| US 5919443                                | A | 06-07-1999          | DE 4242863 A1              | 23-06-1994          |
|   |   |                     | AT 165007 T                | 15-05-1998          |
|   |   |                     | AU 676573 B2               | 13-03-1997          |
|   |   |                     | AU 6808694 A               | 19-07-1994          |
|   |   |                     | CA 2151732 A1              | 07-07-1994          |
|   |   |                     | DE 59308415 D1             | 20-05-1998          |
|   |   |                     | DK 674524 T3               | 01-02-1999          |
|   |   |                     | WO 9414465 A1              | 07-07-1994          |
|   |   |                     | EP 0674524 A1              | 04-10-1995          |
|   |   |                     | ES 2117781 T3              | 16-08-1998          |
|   |   |                     | HU 74269 A2                | 28-11-1996          |
|   |   |                     | JP 8504784 T               | 21-05-1996          |
|   |   |                     | KR 266145 B1               | 15-09-2000          |
|   |   |                     | NZ 258912 A                | 24-06-1997          |
|   |   |                     | SG 66740 A1                | 21-09-1999          |
| US 5597562                                | A | 28-01-1997          | JP 3249147 B2              | 21-01-2002          |
|   |   |                     | JP 4253919 A               | 09-09-1992          |
|   |   |                     | DE 69104777 D1             | 01-12-1994          |
|   |   |                     | EP 0459516 A1              | 04-12-1991          |
|   |   |                     | EP 0459795 A1              | 04-12-1991          |
| US 6162427                                | A | 19-12-2000          | DE 19549232 A1             | 26-06-1997          |
|   |   |                     | WO 9722359 A1              | 26-06-1997          |
|   |   |                     | EP 0868194 A1              | 07-10-1998          |
|   |   |                     | JP 2000507203 T            | 13-06-2000          |
| US 5350741                                | A | 27-09-1994          | JP 2040320 A               | 09-02-1990          |
|   |   |                     | JP 2792862 B2              | 03-09-1998          |
|   |   |                     | AT 108332 T                | 15-07-1994          |
|   |   |                     | DE 68916782 D1             | 18-08-1994          |
|   |   |                     | DE 68916782 T2             | 17-11-1994          |
|   |   |                     | EP 0387352 A1              | 19-09-1990          |
|   |   |                     | WO 9001329 A1              | 22-02-1990          |
|   |   |                     |                            |                     |
| US 5919757                                | A | 06-07-1999          | DE 4242919 A1              | 23-06-1994          |
|   |   |                     | AT 203411 T                | 15-08-2001          |
|   |   |                     | AU 692430 B2               | 11-06-1998          |
|   |   |                     | AU 5810994 A               | 19-07-1994          |
|   |   |                     | CA 2151957 A1              | 07-07-1994          |
|   |   |                     | DE 59310197 D1             | 30-08-2001          |
|   |   |                     | WO 9414466 A1              | 07-07-1994          |
|   |   |                     | EP 0674525 A1              | 04-10-1995          |
|   |   |                     | HU 74270 A2                | 28-11-1996          |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/011875

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)   | Publication<br>date  |
|---|----|---------------------|--|--|
| US 5919757                                | A  |                     | JP 8505610 T<br>KR 266146 B1<br>NZ 259333 A  | 18-06-1996<br>15-09-2000<br>28-10-1996   |
| US 5078997                                | A  | 07-01-1992          | WO 9000397 A1  | 25-01-1990   |
| US 5151265                                | A  | 29-09-1992          | AT 102048 T<br>AU 2724588 A<br>AU 621327 B2<br>CA 1335176 C<br>DD 289470 A5<br>DE 3888197 D1<br>DE 3888197 T2<br>EP 0386106 A1<br>HK 29496 A<br>HU 9400023 A3<br>IE 60875 B1<br>IL 88233 A<br>JP 2732877 B2<br>JP 3500882 T<br>NZ 226791 A<br>PT 88918 A ,B<br>WO 8904177 A1<br>ZA 8808249 A | 15-03-1994<br>01-06-1989<br>12-03-1992<br>11-04-1995<br>02-05-1991<br>07-04-1994<br>18-08-1994<br>12-09-1990<br>23-02-1996<br>28-10-1994<br>24-08-1994<br>18-08-1993<br>30-03-1998<br>28-02-1991<br>26-04-1990<br>01-12-1988<br>18-05-1989<br>25-07-1990 |
| US 4675184                                | A  | 23-06-1987          | JP 58167520 A<br>JP 1452214 C<br>JP 58092619 A<br>JP 62060370 B<br>JP 1645781 C<br>JP 3008323 B<br>JP 58092620 A<br>JP 58092621 A<br>JP 58092622 A<br>DE 3273597 D1<br>EP 0080879 A2   | 03-10-1983<br>25-07-1988<br>02-06-1983<br>16-12-1987<br>13-03-1992<br>05-02-1991<br>02-06-1983<br>02-06-1983<br>02-06-1983<br>06-11-1986<br>08-06-1983   |
| US 2003180253                             | A1 | 25-09-2003          | US 6525102 B1<br>AU 7847500 A<br>BR 0014486 A<br>CA 2386228 A1<br>CA 2477857 A1<br>CN 1402640 T<br>CZ 20021186 A3<br>EP 1220682 A1<br>EP 1491208 A1<br>HU 0203133 A2<br>JP 2003510368 T<br>NO 20021567 A<br>NZ 529856 A<br>PL 354987 A1<br>WO 0124814 A1                                     | 25-02-2003<br>10-05-2001<br>17-09-2002<br>12-04-2001<br>12-04-2001<br>12-03-2003<br>13-11-2002<br>10-07-2002<br>29-12-2004<br>28-12-2002<br>18-03-2003<br>22-05-2002<br>19-12-2003<br>22-03-2004<br>12-04-2001   |
| EP 0229016                                | A  | 15-07-1987          | JP 1920142 C<br>JP 6045551 B<br>JP 62164631 A<br>AT 82857 T<br>CA 1288340 C  | 07-04-1995<br>15-06-1994<br>21-07-1987<br>15-12-1992<br>03-09-1991   |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/011875

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0229016                                | A                   | DE 3782828 D1              | 14-01-1993          |
|   |                     | DE 3782828 T2              | 29-04-1993          |
|   |                     | DE 229016 T1               | 14-01-1988          |
|   |                     | EP 0229016 A2              | 15-07-1987          |
|   |                     | ES 2043609 T3              | 01-01-1994          |
|   |                     | GR 3006807 T3              | 30-06-1993          |
|   |                     | KR 9612064 B1              | 12-09-1996          |

---

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/011875

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/19 A61K47/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, PAJ, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X          | EP 0 373 679 A (AMGEN INC)<br>20. Juni 1990 (1990-06-20)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Seite 2<br>Seite 3, Zeile 1 - Zeile 30<br>Seite 4                             | 1-26               |
| X          | US 5 919 443 A (MICHAELIS ET AL)<br>6. Juli 1999 (1999-07-06)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Spalte 2, Zeile 56 - Spalte 5, Zeile 30<br>Spalte 6, Zeile 14 - Zeile 19 | 1-26               |
|            | -/--  |                    |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Februar 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10/03/2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hars, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X          | US 5 597 562 A (NOMURA ET AL)<br>28. Januar 1997 (1997-01-28)<br>Spalte 1, Zeile 11 - Zeile 14<br>Spalte 2, Zeile 57 - Zeile 63<br>Spalte 3, Zeile 54 - Spalte 5, Zeile 10<br>Spalte 6, Zeile 5 - Zeile 14  | 1-26               |
| X          | US 6 162 427 A (BAUMANN ET AL)<br>19. Dezember 2000 (2000-12-19)<br>Spalte 2, Zeile 55 - Zeile 65   | 1-26               |
| X          | US 5 350 741 A (TAKADA ET AL)<br>27. September 1994 (1994-09-27)<br>Beispiel 1  | 1-26               |
| X          | NOMURA H ET AL: "EFFECT OF A DOSING<br>SOLUTION ON THE NASAL ABSORPTION OF<br>NON-GLYCOSYLATED RECOMBINANT HUMAN<br>GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR IN<br>RATS"<br>BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN (OF<br>JAPAN), PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN,<br>JP,<br>Bd. 19, Nr. 11,<br>1. November 1996 (1996-11-01), Seiten<br>1490-1493, XP000636230<br>ISSN: 0918-6158<br>Zusammenfassung<br>Tabelle 3 | 1-26               |
| X          | USHIROGAWA Y ET AL: "EFFECT OF ORGANIC<br>ACIDS TRYPSIN INHIBITORS AND DIETARY<br>PROTEIN ON THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF<br>RECOMBINANT HUMAN GRANULOCYTE<br>COLONY-STIMULATING FACTOR RHG-CSF IN RATS"<br>INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS<br>(KIDLINGTON),<br>Bd. 81, Nr. 2-3, 1992, Seiten 133-141,<br>XP002319194<br>ISSN: 0378-5173<br>Zusammenfassung<br>Seite 134                            | 1-26               |
| A          | US 5 919 757 A (MICHAELIS ET AL)<br>6. Juli 1999 (1999-07-06)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Spalte 1, Zeile 8 - Zeile 16<br>Spalte 5, Zeile 35 - Zeile 37<br>Tabelle 1<br>Ansprüche 4-7  | 1-26               |

-/-

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A          | US 5 078 997 A (HORA ET AL)<br>7. Januar 1992 (1992-01-07)<br>Spalte 1 - Spalte 2<br>Spalte 5, Zeile 7 - Zeile 17<br>Spalte 6, Zeile 1 - Zeile 42<br>-----                  | 1-26               |
| A          | US 5 151 265 A (HWANG-FELGNER ET AL)<br>29. September 1992 (1992-09-29)<br>Spalte 1, Zeile 22 - Zeile 52<br>Spalte 2, Zeile 15 - Zeile 40<br>Beispiel 1; Tabelle 1<br>----- | 1-26               |
| A          | US 4 675 184 A (HASEGAWA ET AL)<br>23. Juni 1987 (1987-06-23)<br>Spalte 1, Zeile 8 - Zeile 9<br>Spalte 2, Zeile 18 - Zeile 30<br>Beispiel 3; Tabelle 8<br>-----             | 1-26               |
| A          | US 2003/180253 A1 (CHEN BAO-LU ET AL)<br>25. September 2003 (2003-09-25)<br>Absätze '0070!, '0082! - '0084!, '0109!,<br>'0116!, '0118!<br>-----                             | 1-26               |
| A          | EP 0 229 016 A (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI<br>KAISHA; BIOGEN N.V)<br>15. Juli 1987 (1987-07-15)<br>Seite 2, Zeile 1 - Seite 3, Zeile 44<br>Tabellen 1,2<br>-----            | 1-26               |

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument |   | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0373679   | A | 20-06-1990                    | US 5104651 A                      | 14-04-1992                    |
|  |   |                               | AT 107513 T                       | 15-07-1994                    |
|  |   |                               | AU 621695 B2                      | 19-03-1992                    |
|  |   |                               | AU 4668989 A                      | 10-07-1990                    |
|  |   |                               | CA 2005143 A1                     | 16-06-1990                    |
|  |   |                               | DE 68916385 D1                    | 28-07-1994                    |
|  |   |                               | DE 68916385 T2                    | 13-10-1994                    |
|  |   |                               | EP 0373679 A2                     | 20-06-1990                    |
|  |   |                               | ES 2055001 T3                     | 16-08-1994                    |
|  |   |                               | HK 1006812 A1                     | 19-03-1999                    |
|  |   |                               | JP 2888969 B2                     | 10-05-1999                    |
|  |   |                               | JP 3502808 T                      | 27-06-1991                    |
|  |   |                               | WO 9006762 A1                     | 28-06-1990                    |
| US 5919443   | A | 06-07-1999                    | DE 4242863 A1                     | 23-06-1994                    |
|  |   |                               | AT 165007 T                       | 15-05-1998                    |
|  |   |                               | AU 676573 B2                      | 13-03-1997                    |
|  |   |                               | AU 6808694 A                      | 19-07-1994                    |
|  |   |                               | CA 2151732 A1                     | 07-07-1994                    |
|  |   |                               | DE 59308415 D1                    | 20-05-1998                    |
|  |   |                               | DK 674524 T3                      | 01-02-1999                    |
|  |   |                               | WO 9414465 A1                     | 07-07-1994                    |
|  |   |                               | EP 0674524 A1                     | 04-10-1995                    |
|  |   |                               | ES 2117781 T3                     | 16-08-1998                    |
|  |   |                               | HU 74269 A2                       | 28-11-1996                    |
|  |   |                               | JP 8504784 T                      | 21-05-1996                    |
|  |   |                               | KR 266145 B1                      | 15-09-2000                    |
|  |   |                               | NZ 258912 A                       | 24-06-1997                    |
|  |   |                               | SG 66740 A1                       | 21-09-1999                    |
| US 5597562   | A | 28-01-1997                    | JP 3249147 B2                     | 21-01-2002                    |
|  |   |                               | JP 4253919 A                      | 09-09-1992                    |
|  |   |                               | DE 69104777 D1                    | 01-12-1994                    |
|  |   |                               | EP 0459516 A1                     | 04-12-1991                    |
|  |   |                               | EP 0459795 A1                     | 04-12-1991                    |
| US 6162427   | A | 19-12-2000                    | DE 19549232 A1                    | 26-06-1997                    |
|  |   |                               | WO 9722359 A1                     | 26-06-1997                    |
|  |   |                               | EP 0868194 A1                     | 07-10-1998                    |
|  |   |                               | JP 2000507203 T                   | 13-06-2000                    |
| US 5350741   | A | 27-09-1994                    | JP 2040320 A                      | 09-02-1990                    |
|  |   |                               | JP 2792862 B2                     | 03-09-1998                    |
|  |   |                               | AT 108332 T                       | 15-07-1994                    |
|  |   |                               | DE 68916782 D1                    | 18-08-1994                    |
|  |   |                               | DE 68916782 T2                    | 17-11-1994                    |
|  |   |                               | EP 0387352 A1                     | 19-09-1990                    |
|  |   |                               | WO 9001329 A1                     | 22-02-1990                    |
| US 5919757   | A | 06-07-1999                    | DE 4242919 A1                     | 23-06-1994                    |
|  |   |                               | AT 203411 T                       | 15-08-2001                    |
|  |   |                               | AU 692430 B2                      | 11-06-1998                    |
|  |   |                               | AU 5810994 A                      | 19-07-1994                    |
|  |   |                               | CA 2151957 A1                     | 07-07-1994                    |
|  |   |                               | DE 59310197 D1                    | 30-08-2001                    |
|  |   |                               | WO 9414466 A1                     | 07-07-1994                    |
|  |   |                               | EP 0674525 A1                     | 04-10-1995                    |
|  |   |                               | HU 74270 A2                       | 28-11-1996                    |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC17/EP2004/011875

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie   | Datum der<br>Veröffentlichung  |
|--|-------------------------------|---|--|
| US 5919757   | A                             | JP 8505610 T<br>KR 266146 B1<br>NZ 259333 A   | 18-06-1996<br>15-09-2000<br>28-10-1996   |
| US 5078997   | A                             | 07-01-1992 WO 9000397 A1  | 25-01-1990   |
| US 5151265   | A                             | 29-09-1992 AT 102048 T<br>AU 2724588 A<br>AU 621327 B2<br>CA 1335176 C<br>DD 289470 A5<br>DE 3888197 D1<br>DE 3888197 T2<br>EP 0386106 A1<br>HK 29496 A<br>HU 9400023 A3<br>IE 60875 B1<br>IL 88233 A<br>JP 2732877 B2<br>JP 3500882 T<br>NZ 226791 A<br>PT 88918 A ,B<br>WO 8904177 A1<br>ZA 8808249 A | 15-03-1994<br>01-06-1989<br>12-03-1992<br>11-04-1995<br>02-05-1991<br>07-04-1994<br>18-08-1994<br>12-09-1990<br>23-02-1996<br>28-10-1994<br>24-08-1994<br>18-08-1993<br>30-03-1998<br>28-02-1991<br>26-04-1990<br>01-12-1988<br>18-05-1989<br>25-07-1990 |
| US 4675184   | A                             | 23-06-1987 JP 58167520 A<br>JP 1452214 C<br>JP 58092619 A<br>JP 62060370 B<br>JP 1645781 C<br>JP 3008323 B<br>JP 58092620 A<br>JP 58092621 A<br>JP 58092622 A<br>DE 3273597 D1<br>EP 0080879 A2   | 03-10-1983<br>25-07-1988<br>02-06-1983<br>16-12-1987<br>13-03-1992<br>05-02-1991<br>02-06-1983<br>02-06-1983<br>02-06-1983<br>06-11-1986<br>08-06-1983   |
| US 2003180253                                      | A1                            | 25-09-2003 US 6525102 B1<br>AU 7847500 A<br>BR 0014486 A<br>CA 2386228 A1<br>CA 2477857 A1<br>CN 1402640 T<br>CZ 20021186 A3<br>EP 1220682 A1<br>EP 1491208 A1<br>HU 0203133 A2<br>JP 2003510368 T<br>NO 20021567 A<br>NZ 529856 A<br>PL 354987 A1<br>WO 0124814 A1                                     | 25-02-2003<br>10-05-2001<br>17-09-2002<br>12-04-2001<br>12-04-2001<br>12-03-2003<br>13-11-2002<br>10-07-2002<br>29-12-2004<br>28-12-2002<br>18-03-2003<br>22-05-2002<br>19-12-2003<br>22-03-2004<br>12-04-2001   |
| EP 0229016   | A                             | 15-07-1987 JP 1920142 C<br>JP 6045551 B<br>JP 62164631 A<br>AT 82857 T<br>CA 1288340 C  | 07-04-1995<br>15-06-1994<br>21-07-1987<br>15-12-1992<br>03-09-1991   |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/011875

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0229016 A                                       |                               | DE 3782828 D1                     | 14-01-1993                    |
|  |                               | DE 3782828 T2                     | 29-04-1993                    |
|  |                               | DE 229016 T1                      | 14-01-1988                    |
|  |                               | EP 0229016 A2                     | 15-07-1987                    |
|  |                               | ES 2043609 T3                     | 01-01-1994                    |
|  |                               | GR 3006807 T3                     | 30-06-1993                    |
|  |                               | KR 9612064 B1                     | 12-09-1996                    |
| <hr/>  |                               |                                   |                               |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**